

BEST AVAILABLE COPY

PCT/JP03/08217

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

27.06.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年 6月28日

REC'D 15 AUG 2003

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-190616

WIPO PCT

[ST. 10/C]: [JP2002-190616]

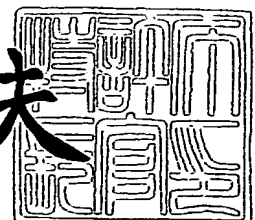
出 願 人
Applicant(s): 高砂香料工業株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 7月31日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 P02-0325

【提出日】 平成14年 6月28日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12P 17/08
C12N 1/14

【発明の名称】 光学活性 γ -デカラクトンの製造法

【請求項の数】 7

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県平塚市西八幡一丁目4番11号 高砂香料工業株式会社 総合研究所内

【氏名】 三橋 勝久

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県平塚市西八幡一丁目4番11号 高砂香料工業株式会社 総合研究所内

【氏名】 飯森 真人

【特許出願人】

【識別番号】 000169466

【氏名又は名称】 高砂香料工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100091096

【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100118773

【弁理士】

【氏名又は名称】 藤田 節

【選任した代理人】

【識別番号】 100096183

【弁理士】

【氏名又は名称】 石井 貞次

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9406577

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 光学活性 γ -デカラクトンの製造法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ヒマシ油、ヒマシ油の加水分解生成物及びリシノール酸からなる群より選択される少なくとも 1 種を含む培地にて、カンジダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*) を培養し、該培地中に生産される γ -ヒドロキシデカン酸をラクトン化することを含む、光学活性 γ -デカラクトンの製造法。

【請求項 2】 ヒマシ油、ヒマシ油の加水分解生成物及びリシノール酸からなる群より選択される少なくとも 1 種を含む培地にて、カンジダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*) を培養し、該培地中に生産される γ -ヒドロキシデカン酸をラクトン化することを含む、R- γ -デカラクトンの製造法。

【請求項 3】 カンジダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*) が、カンジダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*) ATCC74362株、カンジダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*) ATCC60130株、カンジダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*) IF01583株、及び受託番号FERM P-18883として寄託されているカンジダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*) FC58株からなる群より選択される、請求項 1 又は 2 に記載の製造法。

【請求項 4】 培地中に含むヒマシ油、ヒマシ油の加水分解生成物及びリシノール酸からなる群より選択される少なくとも 1 種がヒマシ油である、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の製造法。

【請求項 5】 培地中に含むヒマシ油、ヒマシ油の加水分解生成物及びリシノール酸からなる群より選択される少なくとも 1 種がヒマシ油の加水分解生成物である、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の製造法。

【請求項 6】 ヒマシ油の加水分解生成物が、リパーゼによりヒマシ油を加水分解することにより得た加水分解生成物である、請求項 1 ～ 3 及び 5 のいずれか 1 項に記載の製造法。

【請求項 7】 カンジダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*) FERM P-18883菌株。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、香料等として有用な γ -デカラクトンの微生物を用いた製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】

香料はその原料あるいは製法によって化学的合成品の香料（いわゆる「合成香料」）と化学的合成品以外の香料（いわゆる「天然香料」）の二つに大別される。そして近年の消費者は、「合成品」を避け「天然品」を好む傾向がある。しかしながら、例えば天然食品フレーバーを構成する上で重要な物質である光学活性体 γ -デカラクトン（R- γ -デカラクトン、S- γ -デカラクトン）は、天然物に存在する量が極めて微量であることから、これらを高光学純度で抽出あるいはその他の操作によって分離することは、技術的及び経済的な見地より有利ではない。したがって現状では「合成品」が一般的に安価にかつ大量に供給されており、一方「天然品」の製造規模は小さく、かつ高価なものが多い。

【0003】

そこで、上記「天然香料」を、現在使用されている「合成香料」と同程度に安価にかつ大量に供給する方法が望まれている。かかる供給方法として提案されている方法の中では、一切化学的手法を使わず生物学的手法および物理学的手法のみを用いて、天然物原料あるいはその分解物から天然R- γ -デカラクトンを生産する方法であるとして、微生物を用いる発酵法が注目を浴びている。

【0004】

例えば、ヒマシ油（カスターオイル）またはその加水分解生成物を原料とする微生物を用いた γ -デカラクトンの生産方法としては、特開昭59-82090号公報にアスペルギルス・オリザエ(*Aspergillus oryzae*)、カンジダ・ルゴザ(*Candida rugosa*)、ゲオトリクム・ケレバーニー(*Geotrichum klebannii*)、ヤロウイア・リポリチカ(*Yarrowia lipolytica*)等の微生物を用いて γ -ヒドロキシデカン酸を生産せしめ、これに塩酸等を加え酸性にした後、加熱することによってラクトン化して γ -デカラクトンを製造する方法が開示されている。また、特開

昭 63-56295 号公報および K. A. MAUME らの報告 [Biocatalysis, Vol.5, 79-97(1991)] には、スポロボロミセス・オドラス (*Sporobolomyces odor*) またはロドトルラ・グルチニス (*Rhodotorula glutinis*) を用いてリシノール酸源から γ -ヒドロキシデカン酸を得、同様にラクトン化して γ -デカラクトンを生産する方法が開示されている。また特開平 2-174685 号公報ではアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) 等の微生物を用いて、特開平 3-117494 号公報ではサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 等の微生物を用いて、ヒマシ油またはリシノール酸から γ -ヒドロキシデカン酸を経て γ -デカラクトンを生産する方法が開示されている。さらにこれらの技術に先行して S. Okui らはカンジダ (*Candida*) 属に属する数種の菌株を用いて、リシノール酸の酸化分解過程において γ -ヒドロキシデカン酸および γ -デカラクトンが中間体として存在することを報告している [J. Biochem., Vol.54, No.6, 536-540(1963)]。その他にもヨーロッパ特許公開 997533 ではヤロウィア・リポリチカ (*Yarrowia lipolytica*) を用いてヒマシ油から γ -デカラクトンを 12 g/L にて生産する方法が開示されているが、その生産方法では培養時に乳化剤や pH 調整剤を使用する必要があり、また原料となるヒマシ油の培養系への添加量が 0.0247 kg/L と添加比率が小さいことから、製造上はなはだ非効率的である。さらにこれらの公報等が開示されている微生物は、いずれも本発明で用いる微生物とは別の種に属しており、また菌体と生産物の分離が困難であったり生成量が経済的観点から見て充分でなかったりと必ずしも実用化には適していない。

【0005】

一方、ヒマシ油およびヒマシ油の加水分解生成物以外の成分を炭素源とする方法としては、スポロボロミセス・オドラス (*Sporobolomyces odor*) [S. Taqhara ら, Agric. Biol. chem., Vol.36, No.13, 2585-2587(1972); N. Jourdain ら, "Top. Flavour Res., Proc. Int. Conf", H. Eichhorn 刊, 427-441(1985)] やフザリウム・ポアエ (*Fusarium poae*) [J. Sarris ら, Agric. Biol. chem., Vol.49, No.11, 3227-3230(1985)] を用いて、糖基質から γ -デカラクトンを生産する方法が報告されているが、これらの方法では γ -デカラクトンの生産量が極微量であるため工業的規模での生産には適していない。

従って、乳化剤や pH 調整剤を使用せず、かつ原料であるヒマシ油及び／又はヒマシ油の加水分解生成物を高濃度で添加しても、 γ -ヒドロキシデカン酸及び γ -デカラク톤を効率良く生産できる製造法が望まれていた。

【0006】

一方、天然 γ -デカラク톤中における鏡像体の存在比について、R- γ -デカラク톤が過剰であるとも報告されている [A. Bernreuther ら、J. Chromatography, 481, 363(1989)]。このような R- γ -デカラク톤の純粹光学活性体の製造法としては特開平 4-108782 号公報での化学合成による方法が知られている。

【0007】

また R- γ -デカラク톤は天然物中より抽出することにより得られるラセミ体混合物から、当業者に公知の方法により R- γ -デカラク톤を選択的に分離する方法によって製造することもできる。しかしこの場合、天然物中に存在する R- γ -デカラク톤の量が極めて微量であることと、R- γ -デカラク톤を他の揮発性化合物から分離することは物理的に困難であるため天然物中より抽出することは経済的な方法ではない。したがって前述のような天然化合物に対する高い需要に応えるために、R- γ -デカラク톤の化学合成法又はラセミ体混合物からの分離法とは異なる方法による、効率のよい天然 R- γ -デカラク톤製造法の開発が求められていた。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は上記問題に鑑みなされたものであり、天然の光学活性 γ -デカラク톤の、微生物を用いたより効率的な製造法を提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために、ヒマシ油及び／又はヒマシ油の加水分解生成物を炭素源として、培地中に γ -ヒドロキシデカン酸を高濃度で蓄積することのできる微生物を公知の菌株および自然界から広く探索した。その結果、カンジダ・ソルボフィラ (Candida sorbophila) を用いることにより、乳化剤

や pH 調整剤を使用せず、かつヒマシ油、ヒマシ油の加水分解生成物及びリシノール酸からなる群より選択される少なくとも 1 種を原料として高濃度で添加した場合にも、 γ -ヒドロキシデカン酸を非常に効率よく培地中に生産及び蓄積させることができることを見出した。さらに、そのようにして得られる γ -ヒドロキシデカン酸を酸性条件下で加熱処理することにより、容易に光学活性 γ -デカラクトンを製造することができることも見出した。また、そのようにして製造した光学活性 γ -デカラクトンは、非常に高い生産性で回収された。

【0010】

即ち、本発明は以下の通りである。

ヒマシ油、ヒマシ油の加水分解生成物及びリシノール酸からなる群より選択される少なくとも 1 種を含む培地にて、カンジダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*) を培養し、該培地中に生産される γ -ヒドロキシデカン酸をラクトン化することを含む、光学活性 γ -デカラクトンの製造法。

【0011】

さらに、ヒマシ油、ヒマシ油の加水分解生成物及びリシノール酸からなる群より選択される少なくとも 1 種を含む培地にて、カンジダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*) を培養し、該培地中に生産される γ -ヒドロキシデカン酸をラクトン化することを含む、R- γ -デカラクトンの製造法。

【0012】

ここで、本発明においてカンジダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*) は、カンジダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*) ATCC74362株、カンジダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*) ATCC60130株、カンジダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*) IF01583株、及び受託番号 FERM P-18883 として寄託されているカンジダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*) FC58株からなる群より選択されるものであり得る。

【0013】

また、本発明の製造法においては、ヒマシ油、ヒマシ油の加水分解生成物及びリシノール酸からなる群より選択される少なくとも 1 種を培地中に含ませる場合、ヒマシ油又はヒマシ油の加水分解生成物を用いることが好ましい。さらにヒマ

シ油の加水分解生成物としては、リパーゼによりヒマシ油を加水分解することにより得た加水分解生成物が好ましい。

さらに本発明は、カンジダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*) FERM P-18883菌株に関する。

【0014】

【発明の実施の形態】

本発明の光学活性- γ -デカラクトンの製造法は、カンジダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*) をヒマシ油、ヒマシ油の加水分解生成物及びリシノール酸からなる群より選択される少なくとも1種を含む培地にて培養し、培地中に γ -ヒドロキシデカン酸を生産させて、さらにその γ -ヒドロキシデカン酸をラクトン化することによるものである。

【0015】

(1) カンジダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*)

本発明で用いられるカンジダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*) の具体例としては、カンジダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*) FC58株、カンジダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*) ATCC74362株、カンジダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*) ATCC60130株、カンジダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*) IF01583株等が挙げられるが、これらの例に限定されるものではない。カンジダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*) FC58株は、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に、受託番号FERM P-18883として寄託されている。

【0016】

上記カンジダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*) FC58株は、神奈川県下の一般的な土壌から常法に従って分離され、菌学的性質を同定し、分類学の参考書である [Kurtzman, C.P. ら, "The Yeasts, A Taxonomic Study" 4th edition (1998) Elsevier Science B.V. ; Barnett, J.A. ら, "Yeasts : Characteristics and identification" 3rd ed] に従って確認したところ、カンジダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*) に属する微生物であることが判明した。この自然界から分離した微生物は、カンジダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*) FC58株 (以

降、「FC58株」と略記する)と命名された。

本発明において好適に用いることができるFC58株の菌学的性質は、以下の通りである。

【0017】

(1) YM液体培地における生育: 24~27℃、24時間後に形状は主として球形から卵形となる。

(2) YM寒天培地における生育: 24~27℃、2~3日後に白色~クリーム色で湿っている。

(3) 形態: 球形から卵形であり、多極出芽で増殖する。偽菌糸の形成およびアダムス、ゴロドコバ、麦芽、YM、V-8、ポテトデキストロースの各培地での生育における子嚢胞子の形成は認められない。

(4) 最適生育条件: 24~27℃、pH 5.5~6.0、

(5) 生育の最高温度: 35~37℃

【0018】

(6) ビタミンの要求性: ビタミン欠乏培地での生育は認められない。ビオチン、ピリドキシン、チアミンを要求する。

(7) 発酵性: グルコース(-)、ガラクトース(-)、シュクロース(-)、マルトース(-)、ラクトース(-)、ラフィノース(-)、トレハロース(-)

(8) 資化性: ガラクトース(+)、ソルボース(+)、シュクロース(-)、マルトース(-)、トレハロース(-)、ラクトース(-)、ラフィノース(-)、セロビオース(-)、メリビオース(-)、メレチトース(-)、スターチ(-)、D-キシロース(-)、L-アラビノース(-)、D-リボース(-)、D-ラムノース(-)、D-グルコサミン(-)、N-アセチル-D-グルコサミン(-)、グリセロール(微弱)、エリスリトール(-)、リビトール(-)、D-マンニトール(+)、乳酸塩(微弱)、クエン酸塩(-)、イノシトール(-)

【0019】

尚、上記ATCC及びIFOとは、それぞれ「American Type Culture Collection」及

び「Institution for Fermentation, Osaka, Japan (財団法人発酵研究所)」の略であり、「ATCC」又は「IFO」を付された番号は、それぞれの菌株のカタログ番号を表す。上記カンジダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*) はいずれも、これらのカタログ番号に基づいてそれぞれの機関が保存している菌株から入手して、用いることができる。

【0020】

本発明で用いられるカンジダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*) は、該カンジダ・ソルボフィラをヒマシ油を含む培地中で培養すると、該ヒマシ油を加水分解することができ、さらにそのヒマシ油の加水分解生成物を β 酸化することにより γ -ヒドロキシデカン酸を培養液中に生産及び蓄積することができるという性質を有する。

【0021】

(2) γ -ヒドロキシデカン酸を生産するための培養 (本培養) に用いる培地

本発明における γ -ヒドロキシデカン酸を生産するための培養 (本培養) においては、ヒマシ油、ヒマシ油の加水分解生成物及びリシノール酸からなる群より選択される少なくとも1種を、培地の炭素源として用いる。本発明において、ヒマシ油の加水分解生成物とは、ヒマシ油を化学的又は酵素的に加水分解することにより得られる混合物を意味する。ヒマシ油の加水分解生成物としては、リパーゼによりヒマシ油を加水分解して得た加水分解物 (以下、「リパーゼによる加水分解物」という) が挙げられる。なお、ヒマシ油をリパーゼにより加水分解して得た加水分解物の主成分はリシノール酸である。したがって、ヒマシ油の加水分解生成物は、例えば、ヒマシ油の主要構成脂肪酸であるリシノール酸を主成分として含むものである。

【0022】

ヒマシ油の加水分解に用いるリパーゼとしては、リシノール酸を生産するものであれば特に限定されずに使用可能である。該リパーゼとしては、例えば (名糖産業株式会社) : リパーゼ OF、リパーゼ MY、(天野エンザイム株式会社) : ニューラーゼ F3G、リパーゼ A「アマノ」6、リパーゼ AY「アマノ」30G、リパーゼ F-AP15、リパーゼ G「アマノ」50、リパーゼ M「ア

マノ」10、リパーゼ R「アマノ」G等が挙げられる。リパーゼによる加水分解物は、ヒマシ油からリシノール酸を主成分とする加水分解生成物を製造する条件、例えば、リパーゼをヒマシ油100g当たり0.5g添加し、30℃で24時間インキュベートすることにより、得られる。このようにして得られたリパーゼによる加水分解物は、混合物の状態でそのまま使用することができる。

【0023】

ヒマシ油の加水分解生成物を本発明の本培養培地に含ませる場合には、リパーゼによる加水分解物を、培地に添加することが好ましい。但し、本発明の製造法においては、培地中にヒマシ油が含まれていれば、培養後にはリパーゼによる加水分解物は培地中に含まれることになる。これは、本発明の製造法においては、本発明で用いられるカンジダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*) により培地中のヒマシ油から加水分解生成物が生成されるためである。従って、培地中にヒマシ油を添加しておけば、さらにリパーゼによる加水分解物を添加することは任意工程となる。

【0024】

本発明においては、ヒマシ油、ヒマシ油の加水分解生成物及びリシノール酸からなる群より選択される少なくとも1種を用いればよく、ヒマシ油、ヒマシ油の加水分解生成物又はリシノール酸は、それぞれ単独で用いても2種以上適宜組み合わせ用いてもよい。これらヒマシ油、ヒマシ油の加水分解生成物又はリシノール酸としては、中でもヒマシ油及び／又はヒマシ油の加水分解生成物が好ましい。

【0025】

ヒマシ油、ヒマシ油の加水分解生成物及びリシノール酸からなる群より選択される少なくとも1種を培地に添加する濃度は、培地1Lに対して、通常10～50% (w/v)、好ましくは15～25% (w/v) 程度である。

本発明で使用する培地には、必要に応じて、酵母エキス、麦芽エキス、ポリペプトン、グルコース等の成分をさらに添加してもよく、そのような追加成分を添加した培地を栄養培地として、本発明に係るγ-ヒドロキシデカン酸の生産に用いることができる。

【0026】

ここで、酵母エキス、尿素、コーンステープリカー、硫酸アンモニウム、リン酸水素二アンモニウム等は、窒素源として上記培地に含有させて使用することができる。また、麦芽エキス、ポリペプトン、グルコース等の糖類は、追加炭素源として上記培地に含有させて使用することができる。

【0027】

一方、培地として、ヒマシ油、ヒマシ油の加水分解生成物及びリシノール酸からなる群より選択される少なくとも1種を唯一の炭素源として含む合成培地を使用してもよい。但し、この合成培地に、さらに上記の追加窒素源又は炭素源などの追加成分を添加してもよい。

さらにこれらの培地に、必要に応じて種々の補因子を添加することによりγ-ヒドロキシデカン酸の生産量をより一層増加させることが可能である。

【0028】

補因子としては、例えば、硫酸マンガン、塩化カルシウム、塩化第二鉄、硫酸第一鉄、硫酸第二鉄、硫酸亜鉛、硫酸銅、硫酸マグネシウム、塩化コバルト、モリブデン酸ナトリウム、ホウ素、ヨウ化カリウム等の無機塩類、フラビンモノヌクレオチド (FMN)、フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD)、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD)、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸 (NADP)、コエンザイム A (CoA) 等の補酵素群、アデノシン三リン酸 (ATP) 等のヌクレオチド、L-カルニチン等のビタミン類等が挙げられる。補因子の添加量は微量でよい。

【0029】

本発明で用いられる本培養培地としては、例えば YM 培地、ポテトデキストロース培地又はポテトスクロース培地等にヒマシ油、ヒマシ油の加水分解生成物及びリシノール酸からなる群より選択される少なくとも1種を加えた培地、あるいはそれらの培地に上記の追加成分を任意に添加した培地が挙げられる。

【0030】

(3) 本培養に基づくγ-ヒドロキシデカン酸の生産

本発明では、上記(1)のカンジダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*) を上

記(2)の培地にて培養することにより、培地中に γ -ヒドロキシデカン酸を生産及び蓄積させる。

上記(1)のカンジダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*) は、上記(2)の培地に直接接種して培養しても良いが、好ましくは、そのカンジダ・ソルボフィラを予め通常の培地で種培養したものを上記(2)の培地に接種又は播種して培養する。この種培養の培養条件は、 γ -ヒドロキシデカン酸の生産を行う培養（本培養）と同一でもよいが、使用するカンジダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*) 株が増殖可能な条件であれば、特に限定されない。種培養の際に使用する通常の培地は、固体培地でも液体培地でも良く、またヒマシ油、ヒマシ油の加水分解生成物及びリシノール酸からなる群より選択される少なくとも1種を含有する必要はないが、含有していてもよい。種培養に用いる培地としては、例えばYM斜面寒天培地又はポテトデキストロース斜面寒天培地等が挙げられる。種培養物を本培養のために培地に添加する量は、特に限定されない。しかしながら、例えば種培養物が液体培養物である場合には、吸光度OD 610で30の濃度程度の培養物を本培養時の培地量の1～3%量添加することが好ましい。また、種培養を行った後、前培養を行ってから、上記(2)の培地における本培養を行ってもよい。このような二段階の培養は大規模生産に好適であり、工業生産においては特に有用である。前培養の培養条件は、本培養と同一でもよいが、使用するカンジダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*) 株が増殖可能な条件であれば、特に限定されない。種培養の際に使用する培地には、ヒマシ油、ヒマシ油の加水分解生成物及びリシノール酸からなる群より選択される少なくとも1種を含有する必要はないが、含有していてもよい。

【0031】

本発明の製造法において、使用する培養条件は好氣的条件とする。培養温度は通常20～35℃、好ましくは24～30℃の範囲から適宜選択される。培地のpHは通常5～7、好ましくは5.5～6.5の範囲から適宜選択される。また、培養は、例えば振とうフラスコ中あるいは発酵槽（例えば攪拌及び通気装置付きの発酵槽）中で振とう培養を行う。

【0032】

本培養の培養時間は、 γ -ヒドロキシデカン酸を生産するのに十分な時間であれば特に限定されないが、好ましくは γ -ヒドロキシデカン酸の生産量が最大に達する時間を選択する。この γ -ヒドロキシデカン酸の生産量が最大に達する時間は、培地組成、基質として添加するヒマシ油、ヒマシ油の加水分解生成物及びリシノール酸からなる群より選択される少なくとも1種の添加量、用いる培養装置に応じた通気・攪拌効率等により変化する。上記培養時間としては、例えば培養装置として振とうフラスコを用いた培養では、通常1時間～30日、好ましくは12時間～25日の範囲から適宜選択すればよい。また、発酵槽を用いた培養では、通常1日～20日、好ましくは3～10日の範囲から適宜選択すればよい。発酵槽の使用は、比較的短時間の培養で済むので生産効率上の見地から好ましい。

【0033】

また、上記培養時間の決定は、培地中に生産された γ -ヒドロキシデカン酸を経時的にサンプリングし、これをラクトン化し、得られるR- γ -デカラクトンの生産量をガスクロマトグラフィー (GC)、薄層クロマトグラフィー (TLC)、ガスクロマトグラフィー/質量分析法 (GC-MS) により測定し、さらに場合により標準品との比較等を行って、適切な光学活性- γ -デカラクトンの生産量をもたらす時間を選択すればよい。

【0034】

(4) γ -ヒドロキシデカン酸からの光学活性- γ -デカラクトンの製造

このようにして培地中に生産される γ -ヒドロキシデカン酸は、そのまま医薬中間体として用いることができるが、本発明では、該 γ -ヒドロキシデカン酸をさらにラクトン化により光学活性- γ -デカラクトンに変換して、該光学活性- γ -デカラクトンを製造するために使用する。

ラクトン化は、通常公知の任意のラクトン化方法により行えばよい。本発明の γ -ヒドロキシデカン酸のラクトン化は、上記の培地中に生産された γ -ヒドロキシデカン酸を常法により回収してから行ってもよく、また培養終了後の培地を直接ラクトン化処理することにより、培地中に γ -ヒドロキシデカン酸が含まれたままの状態で行ってもよい。

【0035】

上記ラクトン化には、例えば、従来より行われている培養液中でのラクトン化を用いることができる。その具体例としては、培養終了後の培養液に希塩酸や希硫酸等の酸を加えて当該培養液のpHを酸性化することによって行う方法が挙げられる。

【0036】

本発明においては、より天然に近い状態の化合物として光学活性- γ -デカラクトンを得るために、ラクトン化を、培養液のpHを酸性化することなくそのままの状態で行う方法を用いることが好ましい。本発明においては培養終了時の培養液のpHがすでに3.0～4.5の範囲で酸性側に傾いているため、培養液のpHを酸性化することなく、酸性条件の培養液を得ることができる。この酸性条件の培養液は、pHを酸性化する処理を行うことなく、通常10分～1時間程度、好ましくは10～30分間程度加熱することによって、該培養液中に含まれる γ -ヒドロキシデカン酸のラクトン化を達成することができる。この加熱温度は、70～130℃程度、好ましくは90～120℃程度の温度範囲に設定される。また本発明においてラクトン化を行う際は、培地が酸性条件下であればよく、好ましくはpH2～5である。

【0037】

本発明においては、このような γ -ヒドロキシデカン酸のラクトン化によって、 γ -ヒドロキシデカン酸を光学活性- γ -デカラクトンに変換することができる。

かくして得られる光学活性- γ -デカラクトンは、遠心分離等の方法により培養液から菌体を分離および除去した後、溶剤抽出および蒸留等の常法によって当該培養液中から回収及び精製すればよい。

【0038】

本発明の光学活性 γ -デカラクトンの製造法は、R- γ -デカラクトンを高光学純度で得ることができる。

R- γ -デカラクトンは飲料、チューインガム、果汁、タバコ製品、医薬品製剤、香料、香料入り製品などへの官能性の付加あるいは強化・高揚に用いること

ができ、またR- γ -デカラクトンはS- γ -デカラクトンと比較し香りの強度が強く、キャラクターとしてよりナチュラルなフルーツ感を持つという利点を有することが知られている [(A.Mosandleら、J.Agric. Food Chem, .37,413(1989)]

【0039】

本発明の製造法は、カンジダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*) を用いることを特徴とする。本発明の製造法に従えば、R- γ -デカラクトンを高光学純度で得ることができる。また本発明の光学活性- γ -デカラクトン製造法においては、R- γ -デカラクトンの生産効率が低い。本発明の製造法によって、このようにR- γ -デカラクトンの高い生産効率を達成できるのは、おそらく本発明の製造系においてカンジダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*) が得られたR- γ -デカラクトンを崩壊させにくいという特徴を示すためであり、特に、カンジダ・ソルボフィラがR- γ -デカラクトンを分解しないことが原因であると考えられる。但し本発明の範囲は、このような仮説理論に基づいて制限されるものではない。

【0040】

以上説明した通り、本発明の方法を用いれば、純度の高いR- γ -デカラクトンを効率良く製造することが容易になり、工業生産における作業性を向上させることができる。

【0041】

【実施例】

以下に、実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例によって何ら限定されるものではない。

なお、以下の実施例において、ガスクロマトグラフィー (GC) 分析は、以下の通りに行なった。

機器：ヒューレットパッカード製 5890型

カラム：BC-WAX (GLサイエンス社製) 直径0.25mm×長さ30m

温度：40～230℃

内部標準試料：1.0v/v%デカン酸エチル

各実施例で生産された γ -デカラクトンの光学純度はGC分析により測定した。(機器: G3000 (日立製)、カラム: CHIRASIL-DEX-CB、直径0.25 mm×長さ25 m)。

【0042】

[実施例1]

FC58株を、YM斜面寒天培地に接種して、27℃で3日間培養して活性化した。また、前培養のための培地として、300 mL容三角フラスコに酵母エキス0.09 g、麦芽エキス0.09 g、ポリペプトン0.15 g及びグルコース0.3 gを入れ、蒸留水を加えて総量30 mL、pH 6としたものを、オートクレーブで121℃にて15分間滅菌して調製した。冷却した該培地に、上記の通り活性化したFC58株を接種し、回転式振とう培養装置を用いて27℃にて150 rpmで24時間振とう培養を行ったものを、前培養液とした。さらに、続いて行う本培養のための本培養培地を調製した。すなわち、500 mL容坂口フラスコに酵母エキス0.3 g、麦芽エキス0.3 g及びポリペプトン0.5 gを入れ、蒸留水を加えて総量100 mL、pH 6とし、さらにヒマシ油20 gを添加したものを、オートクレーブで121℃にて15分間滅菌して調製した。次いで、冷却した該本培養培地に、上記の前培養液を2 mL接種し、27℃にて150 rpmで振とう培養することにより、本培養を行った。培養中のpH調整は行わなかった。なお培養後の培養液のpHは4.06であった。培養開始後3日目から経時的に培養液を無菌的に5 mLずつサンプリングし、サンプリングした培養液(試料)をそれぞれ100℃で20分間加熱することにより γ -ヒドロキシデカン酸のラクトン化を行った。このようなラクトン化処理後、この試料を酢酸エチルで抽出し、分離した有機層を内票法(内部標準試料としてデカン酸エチルを使用)によるガスクロマトグラフィー(GC)分析で定量した。この結果、培養開始後14日目の培養液について、生産されるR- γ -デカラクトンの量が最大となった。このような培養開始後14日目の培養液から得られたR- γ -デカラクトンの生産量は、本培養培地1 L当たり8.41 gであった。光学純度は100% eeであった。

【0043】

[実施例 2]

ヒマシ油 20 g の代わりにリシノール酸（純度 80 % 以上；和光純薬工業（株）製）20 g を用いた以外は、実施例 1 と同様にして R- γ -デカラクトンの製造を行った。その結果、培養開始後 20 日目の培養液について、生産される R- γ -デカラクトンの量が最大となった。このような培養開始後 20 日目の培養液から得られた R- γ -デカラクトンの生産量は、本培養培地 1 L 当たり 21.89 g であった。光学純度は 100 % ee であった。

【0044】

[実施例 3]

本培養培地に硫酸マンガン ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 1.7 mg、塩化カルシウム ($\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0.55 mg、塩化第二鉄 ($\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0.375 mg、硫酸亜鉛 ($\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 2.2 mg、硫酸銅 ($\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0.4 mg、硫酸マグネシウム ($\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 5.9 mg、塩化コバルト ($\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0.28 mg、モリブデン酸ナトリウム ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0.26 mg、ホウ素 (H_3BO_3) 0.4 mg 及びヨウ化カリウム (KI) 0.06 mg を添加して使用したこと以外は、実施例 2 と同様にして R- γ -デカラクトンの製造を行った。その結果、培養開始後 20 日目の培養液について、生産される R- γ -デカラクトンの量が最大となった。このような培養開始後 20 日目の培養液から得られた R- γ -デカラクトンの生産量は、本培養培地 1 L 当たり 27.37 g であった。光学純度は 100 % ee であった。

【0045】

[実施例 4]

FC58 株を、YM 斜面寒天培地に接種して、27℃で3日間培養して活性化した。また、前培養のための培地として、500 mL 容坂口フラスコに酵母エキス 0.3 g、麦芽エキス 0.3 g、ポリペプトン 0.5 g 及びグルコース 1.0 g を入れ、蒸留水を加えて 100 mL、pH 6 としたものを、オートクレーブで 121℃にて15分間滅菌して調製した。冷却した該培地に、上記の通り活性化した FC58 株を接種し、回転式振とう培養装置を用いて 27℃で 150 rpm、24 時間振とう培養を行ったものを、前培養液とした。さらに、続いて行う本培養のた

めの本培養培地を調製した。すなわち、5 L容ジャーファーメンターに酵母エキス6.0 g、麦芽エキス6.0 g、ポリペプトン10.0 g、硫酸マンガン ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 34 mg、塩化カルシウム ($\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 11 mg、塩化第二鉄 ($\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 7.5 mg、硫酸亜鉛 ($\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 44 mg、硫酸銅 ($\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 8.0 mg、硫酸マグネシウム ($\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 118 mg、塩化コバルト ($\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 5.6 mg、モリブデン酸ナトリウム ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 5.2 mg、ホウ素 (H_3BO_3) 8.0 mg 及びヨウ化カリウム (KI) 1.2 mg を入れ、蒸留水を加えて2000 mL、pH 6 とし、リシノール酸 (純度80%以上; 和光純薬工業(株)製) 400 g を添加したものを、オートクレーブで121℃にて15分間滅菌して調製した。冷却した該本培養培地に上記の前培養液を40 mL 接種し、攪拌羽根の回転数600 rpm、エア-通気量1000 mL/分で27℃にて培養を行うことにより、本培養を行った。培養中のpH調整は行わなかった。なお培養後の培養液のpHは4.75であった。培養開始後3日目から経時的に培養液を無菌的に5 mL ずつサンプリングし、サンプリングした培養液 (試料) をそれぞれ100℃で20分間加熱することにより γ -ヒドロキシデカン酸のラクトン化を行った。このようなラクトン化処理後、この試料を酢酸エチルで抽出し、分離した有機層を内票法 (内部標準試料としてデカン酸エチルを使用) によるGC分析で定量した。この結果、培養開始後10日目の培養液について、生産されるR- γ -デカラクトンの量が最大となった。このような培養開始後10日目の培養液から得られたR- γ -デカラクトンの生産量は、本培養培地1 L 当たり49.94 g であった。光学純度は100% ee であった。

【0046】

[実施例5]

リシノール酸 (純度80%以上; 和光純薬工業(株)製) 400 g の代わりにヒマシ油600 g のリパーゼ (リパーゼOF; 名糖産業株式会社製) による加水分解物を用いた以外は、実施例4と同様にしてR- γ -デカラクトンの製造を行った。この結果、培養開始後5日目の培養液について、生産されるR- γ -デカラクトンの量が最大となった。このような培養開始後5日目の培養液から得られた

R- γ -デカラクトンの生産量は、本培養培地1 L当たり40.50 gであった。光学純度は100% eeであった。

【0047】

[実施例6]

カンジダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*) FC58株の代わりに、カンジダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*) ATCC74362株、カンジダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*) ATCC60130株又はカンジダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*) IF01583株を用いた以外は、実施例2と同様にして光学活性 γ -デカラクトンの製造を行った。その結果、各菌種を用いた場合において、それぞれ培養開始後19日目、11日目、11日目の培養液について、生産される γ -デカラクトンの量が最大となった。このような生産量が最大量になった培養液から得られた γ -デカラクトンの生産量は、本培養培地1 L当たりそれぞれ13.75 g、12.97 g、12.97 gであった。

【0048】

[参考例1]

FC58株の代わりに、高い γ -デカラクトン生産能をもつとして一般的に知られているヤロウィア・リポリチカ (*Yarrowia lipolytica*) IF00717株を用いた以外は実施例2と同様にして γ -デカラクトンの製造を行った。その結果、培養開始後6日目の培液について、生産される γ -デカラクトンの量が最大となった。このような培養開始後6日目の培養液から得られた γ -デカラクトンの生産量は本培養培地1 L当たり4.90 gであった。しかしながら、その後経時的に γ -デカラクトンの生産量を追跡したところ6日目以降は本培養培地1 L当たりの γ -デカラクトン量が減少しはじめ、培養開始後23日目における γ -デカラクトンの生産量は本培養培地1 L当たり3.17 gであった。

【0049】

【発明の効果】

本発明によれば、光学活性 γ -デカラクトン、中でもR- γ -デカラクトンを高い生産効率で容易に得ることができる。また、本発明の製造法の間工程において γ -ヒドロキシデカン酸を効率良く生産することができる。本発明の製造法

は、培地に乳化剤や pH 調整剤を使用する必要がなく、また原料であるヒマシ油、ヒマシ油の加水分解生成物及びリシノール酸からなる群より選択される少なくとも 1 種を大規模生産に有用な高濃度にて培地に添加して使用できることから、工業的生産において極めて有利に使用することができる。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 天然の γ -デカラクトンの、微生物を用いたより効率的な製造法を提供する。

【解決手段】 ヒマシ油、ヒマシ油の加水分解生成物及びリシノール酸からなる群より選択される少なくとも1種を含む培地にて、カンジダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*) を培養し、該培地中に生産される γ -ヒドロキシデカン酸をラクトン化することを含む、光学活性 γ -デカラクトンの製造法。

【選択図】 なし

特願 2002-190616

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000169466]

1. 変更年月日

1998年11月26日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都大田区蒲田5丁目37番1号 ニッセイアロマスクエア

17・18階

氏 名

高砂香料工業株式会社

2. 変更年月日

1999年 3月 4日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都大田区蒲田五丁目37番1号

氏 名

高砂香料工業株式会社